

## PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE RESVERATROL EN CULTIVOS CELULARES

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con cultivos de células en suspensión inducidas a producir resveratrol y con medios de cultivo que acumulan el resveratrol a concentraciones superiores a su límite de solubilidad. En particular, la invención se relaciona con el empleo de ciclodextrinas metiladas aleatoriamente como elicitores de la síntesis de resveratrol en células productoras en suspensión y como acumuladores de resveratrol en el  
10 medio de cultivo de células productoras y excretoras de resveratrol. La invención también se refiere a un procedimiento para la producción de resveratrol en cultivos celulares.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los estilbenoides son compuestos fenólicos biológicamente activos que exhiben un  
15 amplio espectro de actividad antibiótica y farmacológica.

Se sabe que ciertas plantas, por ejemplo, la vid, pueden sintetizar estilbenoides como mecanismo adaptativo en respuesta a un estrés, tal como la irradiación de rayos ultravioleta o una infección microbiana (Derks et al. 1995. "Stilbene phytoalexins and disease resistance in *Vitis*". In *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*, M. Daniel and R.P. Purkayastha,  
20 eds., Marcel Dekker, Inc. USA, pp. 287-315). Uno de los principales constituyentes de estos compuestos es el trans-resveratrol o t-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Langcake, P. and Pryce, R.J. 1976. "The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury", *Physiol. Plant. Pathol.* 9:77-86).

25 El isómero cis-resveratrol se suele encontrar en extractos de plantas que producen t-resveratrol y productos derivados. Su presencia se debe a la lenta fotoisomerización del isómero trans por irradiación con luz ultravioleta (Mattivi, F. et al. 1995. "Isolation, characterization and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers" *J. Agric. Food Chem.* 43:1820-1823).

30 En base a estudios epidemiológicos y de laboratorio implicando humanos, animales, células animales en cultivo y ensayos enzimáticos, se ha puesto de manifiesto que los estilbenoides y, en particular el resveratrol, tienen efectos favorables para la salud (Jang, et

al. 1997. "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", *Science* 275:218-220) y por eso es deseable la inclusión en la dieta humana y animal de productos ingeribles que contienen resveratrol.

El resveratrol está presente en el vino y puede estar implicado en los efectos  
 5 saludables del consumo moderado de vino. Se ha propuesto el incremento en el consumo de resveratrol como una vía de reducir la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares en humanos (Soleas, et al. 1997. "Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention", *J. Clin. Lab. Anal.* 11:287-313). El resveratrol y los extractos de plantas que contienen resveratrol se han mostrado efectivos en la prevención y terapia de la  
 10 arteroesclerosis (Arichi, et al. 1982. "Effect of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism" *Chem. Pharm. Bull.* 30:1766-1770), como agente antiinflamatorio (Kimura, et al. 1985. "Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes" *Biochem. Biophys Acta* 834:275-278) y como agente anti-hiperoxidativo (Kimura et al. 1983. "Effects of stilbene components of roots of  
 15 *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats" *Planta Medica.* 49: 51-54). El resveratrol ha mostrado una inhibición significativa de formación de criptas en colon aberrante en un modelo de rata tratado con un agente carcinogénico (azoximetano), sugiriendo su utilidad como inhibidor de generación de tumores en humanos (Steele et al. 1998. "Cancer chemoprevention drug development strategies for resveratrol", *Pharm. Bio.*  
 20 36:62-68 suppl.). Resveratrol también se ha descrito como promotor de la formación de nitróxidos que son agentes vasodilatadores y anti-agregación plaquetaria (Fitzpatrick et al. 1993. "Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products" *Am. J. Physiol.* 265: H774-H778).

Teniendo en cuenta el papel beneficioso del resveratrol sobre la salud humana y  
 25 animal, es importante poder disponer de una fuente biológica adecuada que permita la obtención de resveratrol en cantidades suficientes para satisfacer la demanda. Con esta finalidad se han llevado a cabo diversos estudios.

En un estudio, plantas enteras de vid se han tratado con cloruro de aluminio, que actúa como agente elicitador de la síntesis de resveratrol, para aumentar el contenido en  
 30 resveratrol de la planta y los productos derivados de ella, como la uva, el mosto y el vino (Jeandet et al. "Utilisation du chlorure d'aluminium comme agent éliciteur de la synthèse du resvératrol", solicitud de patente WO97/18715).

En otro estudio, el gen o una porción del gen de la resveratrol sintasa obtenido de una planta que produce resveratrol ha sido transferido a una planta que no produce resveratrol de forma natural para que lo exprese constitutivamente y acumule el derivado resveratrol glucósido en sus tejidos (Hipskind, J.D. "Transgenic plants modified to contain resveratrol glucoside and uses thereof", solicitud de patente WO00/44921).

En otro estudio, suspensiones de células vegetales procedentes de plantas que producen resveratrol han sido elicidadas con trozos de paredes celulares de hongos para inducir la síntesis de resveratrol y su acumulación en el medio de cultivo y en las células (Liswidowati, et al. 1991. "Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells" *Planta* 183:307-314).

En otro estudio, se describe la capacidad de una ciclodextrina, concretamente, la heptakis(2,6-di-O-metil- $\beta$ -ciclodextrina) (DIMEB) para inducir la síntesis de t-resveratrol en suspensiones celulares de vid (*Vitis vinifera* var. Gamay), el cual es excretado al medio de cultivo (Morales et al. 1998. "Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53:179-187). Como es conocido, las ciclodextrinas comparten la propiedad de incrementar la solubilidad acuosa de compuestos poco solubles en agua mediante la formación de complejos de inclusión. Los complejos de inclusión se forman cuando una molécula huésped se aloja en la cavidad central de la molécula de ciclodextrina, teniendo el conjunto una solubilidad similar a la de la ciclodextrina libre (Saenger, W. 1980. "Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19:344-362). En virtud de estas propiedades el t-resveratrol excretado por las células puede formar complejos de inclusión con las ciclodextrinas, pudiéndose acumular en el medio de cultivo a concentraciones superiores a su límite de solubilidad acuoso sin precipitar.

No obstante, diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que, contrariamente a lo que se podía esperar, no todas las ciclodextrinas poseen la capacidad de actuar como elicitores de la síntesis de resveratrol en cultivos celulares, por lo que sigue existiendo la necesidad de seguir investigando en este campo.

### 30 COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar un procedimiento para producir resveratrol en un cultivo de células en suspensión.

La solución proporcionada por la invención se basa en que los inventores han identificado una ciclodextrina, concretamente una  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) que tiene una elevada capacidad para inducir la síntesis de resveratrol, en particular, t-resveratrol, en células productoras en suspensión y de acumular el resveratrol excretado al medio de cultivo. Un procedimiento para producir resveratrol en células productoras en suspensión como el descrito en esta invención permite obtener cantidades elevadas de resveratrol, en particular, t-resveratrol.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye el empleo de una BCDMA como elicitor de la síntesis de resveratrol en células productoras de resveratrol en suspensión y como acumulador de resveratrol excretado al medio de cultivo de dichas células en suspensión.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un método para inducir la síntesis de resveratrol en células productoras en suspensión, mediante el empleo de una BCDMA.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para acumular en el medio de cultivo el resveratrol producido y excretado por células en suspensión a concentraciones superiores a su límite de solubilidad, mediante la adición de una BCDMA al medio de cultivo.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la producción de resveratrol, y, en particular, t-resveratrol, que comprende incubar células productoras de resveratrol en presencia de una BCDMA.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 son unos cromatogramas del sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Gamay correspondientes al inicio de la incubación y a las 96 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene una BCDMA, en particular, RAMEB. El espectro UV-vis de los picos es registrado simultáneamente y comparado con la librería de patrones auténticos.

La Figura 2 muestra el espectro UV-vis de t-resveratrol auténtico y de sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Gamay correspondientes al inicio de la incubación y a las 96 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene una BCDMA, en particular, RAMEB.

La Figura 3 muestra el espectro UV-vis de t-resveratrol auténtico y de sobrenadante

de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Monastrell correspondientes al inicio de la incubación y a las 48 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene una BCDMA, en particular, RAMEB.

La Figura 4 son unos cromatogramas del sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Monastrell correspondientes al inicio de la incubación y a las 48 horas de incubación en un medio que contiene una BCDMA, en particular, RAMEB. El espectro UV-vis de los picos es registrado simultáneamente y comparado con la librería de patrones auténticos.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se relaciona, en general, con el empleo de una ciclodextrina de 7 unidades de glucosa, la cicloheptamilosa, metilada aleatoriamente con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, es decir, que posee entre 11 y 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina, como elicitor de la síntesis de resveratrol en células productoras de resveratrol de forma natural, en suspensión, y como acumulador de resveratrol en medio de cultivo de células productoras de resveratrol, bien de forma natural o bien porque han adquirido artificialmente dicha capacidad, y excretoras, en suspensión.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “ $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13” se refiere a un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  y cuyos grupos hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o derivatizados mediante metilación, portando dichas posiciones grupos químicos tipo metoxi ( $\text{CH}_3\text{-O-}$ ), con la condición de que posee de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina. En una realización particular, dicha ciclodextrina metilada aleatoriamente contiene 12 ó 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina, por ejemplo, una ciclodextrina metilada aleatoriamente con un grado de sustitución comprendido entre 12 y 13, identificada como RAMEB, que posee un peso molecular de 1.317 aproximadamente, que es ligeramente inferior al de DIMEB, de 1.331 aproximadamente, una  $\beta$ -ciclodextrina constituida por 7 unidades de D-glucosa, metilada en todas las posiciones 2 y 6 de dichas unidades de glucosa pero no en la 3, con un grado de sustitución por tanto de 14 [véase Szejtli J., *Medicinal Research Reviews*, Vol. 14, 3;353-386 (1994), en particular, las páginas 356 y 357 donde se mencionan algunas características

distintivas entre DIMEB y RAMEB]. En otra realización particular, dicha BCDMA contiene de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina, por ejemplo, tal como la BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, identificada como CAVASOL® W7 M (Wacker, Alemania), que posee un peso molecular de 1.310 aproximadamente.

5           Análogamente, tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “células productoras de resveratrol de forma natural”, se refiere a células procedentes de una planta que posee de forma natural la capacidad de sintetizar resveratrol, por ejemplo, *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucaliptus sp.*, *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactilifera*,  
10 *Festuca versuta*, *Carex fedia*, *Veratrum grandiflorum*.

Asimismo, tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “células productoras de resveratrol de forma artificial”, se refiere a células procedentes de un organismo que, aunque no posea de forma natural la capacidad de sintetizar resveratrol, ha adquirido dicha capacidad mediante procesos de manipulación genética incluyendo transgénesis, por  
15 ejemplo, alfalfa, soja, o, en general, cualquier otra planta no productora de resveratrol de forma natural.

Asimismo, en la presente invención, a menos que se explicite otra cosa, el término “planta” u “organismo” incluye partes, tejidos, células o protoplastos procedentes de la planta o del organismo, cultivos de células, cultivos de tejidos, callos, óvulos, embriones y  
20 semillas procedentes en última instancia de la planta o el organismo.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método para inducir la síntesis de resveratrol en un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural, en suspensión, que comprende incubar dichas células en presencia de una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 bajo condiciones que permiten la síntesis de  
25 resveratrol por dichas células. En general, cualquier planta que produzca resveratrol de forma natural puede servir como fuente adecuada de líneas celulares para ser elicitadas en la síntesis de resveratrol en un cultivo celular en suspensión. Las condiciones de incubación (temperatura, fotoperiodo, agitación, relación de hormonas auxina/citokinina, etc.) dependerán, entre otros factores, de las líneas celulares a incubar. A modo simplemente  
30 ilustrativo, cuando dichas células productoras de resveratrol son células de vid (*Vitis vinifera*) variedad Gamay o Monastrell, éstas se pueden cultivar en medio líquido, con una

relación de hormonas auxina/citokinina intermedia, por ejemplo 0,1 mg de ácido  $\alpha$ -naftalenacético/0,2 mg de kinetina por litro, en presencia de una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, por ejemplo, la ciclodextrina identificada como RAMEB, con agitación orbital de 1 a 2 centímetros a 90 a 150 rpm, entre 20°C y 28°C, bajo  
5 un fotoperiodo de 0 a 16 horas de iluminación (de 800 a 5.000 lux) y de 8 a 24 horas de oscuridad, para producir resveratrol, en particular, t-resveratrol.

En la presente invención, un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural es inducido en determinadas condiciones para que sinteticen ese compuesto. En el proceso de inducción natural, oligosacáridos procedentes de la pared celular de un hongo  
10 invasor elicitán a las células de las plantas productoras de resveratrol de forma natural, las cuales ponen en marcha mecanismos de defensa que incluyen entre otros la síntesis de fitoalexinas. En determinadas especies vegetales las fitoalexinas producidas son de naturaleza estilbenoide y, en concreto, el t-resveratrol. En cultivos celulares, algunas ciclodextrinas (véase el Ejemplo 1) pueden actuar como elicitores al igual que los  
15 oligosacáridos del hongo invasor, poniendo en marcha los mecanismos de defensa de las células vegetales que conducen a la síntesis de t-resveratrol.

Como es conocido, las ciclodextrinas son unos compuestos con forma troncocónica que presentan una cavidad de un tamaño tal que permite el alojamiento de moléculas más pequeñas formando complejos de inclusión. La cavidad de las ciclodextrinas es  
20 sustancialmente menos polar que el medio acuoso, por lo que el tipo de moléculas huésped es de naturaleza poco polar y, por tanto, de baja solubilidad en medio acuoso. Las ciclodextrinas son capaces de elevar significativamente la solubilidad en medio acuoso de muchos compuestos de baja polaridad siendo el mecanismo aceptado para esta propiedad el de formación de complejos de inclusión de tal forma que el complejo posee una solubilidad  
25 en medio acuoso muy similar a la de la ciclodextrina libre. Así, las ciclodextrinas pueden ser utilizadas para preparar soluciones acuosas de compuestos poco polares a concentraciones elevadas. Del mismo modo, las ciclodextrinas adicionadas a un medio de cultivo pueden elevar la solubilidad de las moléculas poco polares presentes en el medio, incluyendo aquéllas que las células que están creciendo en el medio puedan producir.

30 Los complejos de inclusión están en equilibrio con la ciclodextrina libre y la molécula huésped libre. Así, los efectos que la molécula huésped pueda ocasionar sobre las células en crecimiento o las transformaciones que la molécula huésped pueda sufrir por la

acción de factores químicos, físicos o biológicos del cultivo o externos a él dependen de la forma libre.

El resveratrol sintetizado por un cultivo de células y excretado al medio que contenga ciclodextrinas puede formar complejos de inclusión con éstas y llegar a acumularse en esta forma hasta concentraciones similares a la ciclodextrina presente en el medio.

La acumulación de resveratrol en forma de complejo de inclusión con ciclodextrinas presenta numerosas ventajas sobre su acumulación libre, entre las que se encuentran las siguientes: (1) la concentración que puede alcanzar en el medio es más elevada; (2) el complejo está más protegido de transformaciones físico-químicas que el resveratrol libre; y (3) los posibles efectos de retroinhibición de la síntesis de resveratrol por las células son menores puesto que la concentración de resveratrol libre es menor.

Por tanto, cualquier cultivo de células con capacidad de producir y excretar resveratrol al medio de cultivo puede beneficiarse de las ventajas de incluir ciclodextrinas como acumuladores del resveratrol en el medio. El modo de acumular resveratrol en el medio de cultivo puede aplicarse a toda suspensión de células que produzca resveratrol y lo excrete al medio de cultivo, bien constitutivamente o bien mediante elicitación.

Consecuentemente, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para acumular en un medio de un cultivo de células productoras de resveratrol, bien de forma natural o bien de forma artificial, en suspensión, el resveratrol excretado por dichas células, a concentraciones superiores al límite de solubilidad en dicho medio exento de ciclodextrinas, que comprende añadir una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 a dicho medio de cultivo.

La invención proporciona, además, un procedimiento para la producción de resveratrol, en particular, t-resveratrol, en un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural, en suspensión, que comprende incubar dichas células en presencia de una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 bajo condiciones que permiten la síntesis de resveratrol y su excreción al medio de cultivo, y, si se desea, aislar el resveratrol del medio de cultivo.

En general, cualquier planta que produzca resveratrol de forma natural puede servir como fuente de líneas celulares para producir resveratrol en un cultivo celular en suspensión. Las condiciones de incubación (temperatura, fotoperiodo, agitación, relación de hormonas auxina/citokinina, etc.) dependerán, entre otros factores, de las líneas celulares a incubar. A



modo simplemente ilustrativo, cuando dichas células productoras de resveratrol son células de vid (*Vitis vinifera*) variedad Gamay o Monastrell, éstas se pueden cultivar en medio líquido, con una relación de hormonas auxina/citokina intermedia, por ejemplo 0,1 mg de ácido  $\alpha$ -naftalenacético/0,2 mg de kinetina por litro, en presencia de una BCDMA con un  
5 grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, por ejemplo, la ciclodextrina identificada como RAMEB, con agitación orbital de 1 a 2 centímetros a 90 a 150 rpm, entre 20°C y 28°C, bajo un fotoperiodo de 0 a 16 horas de iluminación (de 800 a 5.000 lux) y de 8 a 24 horas de oscuridad, para producir resveratrol, en particular, t-resveratrol.

El resveratrol puede ser identificado analizando químicamente una parte del cultivo  
10 celular, por ejemplo, el material biológico o el medio de cultivo, mediante métodos químicos convencionales, por ejemplo, mediante extracción orgánica seguida de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC) sola o seguida de espectrometría de masas (GC-MS) o electroforesis capilar (CE).

El resveratrol puede aislarse de una parte del cultivo celular por métodos  
15 convencionales, por ejemplo, mediante extracción con disolventes orgánicos tales como dietil éter o metanol. Alternativamente, una parte del cultivo celular que produce resveratrol puede también usarse en forma fresca, congelada o deshidratada.

La producción de resveratrol mediante un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural reporta ventajas sobre otros métodos de producción conocidos,  
20 tales como los métodos basados en la extracción a partir de plantas o partes de plantas que lo producen de forma natural o por transgénesis, o basados en su síntesis química. Entre dichas ventajas se encuentran: (1) el cultivo de células produce específicamente el isómero t-resveratrol, no observándose otros compuestos de naturaleza fenólica, si bien este isómero puede fotoisomerizar; (2) la producción por el cultivo no está sometida a limitaciones  
25 estacionales o climáticas asociadas con las plantas cultivadas; (3) el resveratrol es producido de forma natural por las células, lo que incrementa la satisfacción del consumidor y es más respetuoso con el medio ambiente que el resveratrol producido mediante síntesis química; y (4) frente a la producción del resveratrol por organismos manipulados genéticamente, el cultivo productor puede ser una cepa natural, lo cual es, en general, mejor aceptado por el  
30 consumidor.

El resveratrol puede ser aislado del cultivo para ser usado como un extracto crudo o como un compuesto purificado. La administración a humanos o animales de resveratrol

producido por un cultivo de células produce efectos terapéuticos y nutracéuticos incluyendo, pero no limitado a los beneficios recibidos de un antioxidante, un inhibidor de agregación plaquetaria, un inhibidor del metabolismo del araquidonato, un inhibidor de proteína kinasa, un inductor de muerte celular por apoptosis en células tumorales, un antagonista de receptores de estrógenos, un inhibidor de ribonucleótido reductasa, un inhibidor de iniciación de tumores, un inhibidor de la promoción de tumores, un inhibidor de la progresión y diferenciación de tumores, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 y de la inducción de ciclooxigenasa-2, un modulador de la síntesis y liberación de lipoproteínas así como otros efectos beneficiosos. El resveratrol producido por un cultivo de células es también útil como protector contra la radiación ultravioleta, un estabilizador de agentes de biocontrol contra el daño por radiación ultravioleta y un agente en el almacenamiento de energía fotoquímica. Basado en el papel del resveratrol confiriendo resistencia a las plantas contra patógenos fúngicos, el resveratrol producido por un cultivo de células también podría tener aplicación como agente antifúngico y antibacteriano en humanos.

El resveratrol producido por las células inducidas y acumulado en el medio es útil para la mejora de la nutrición humana y animal. Partes del cultivo ricas en resveratrol pueden ser utilizadas como alimento para humanos y animales. Composiciones comestibles enriquecidas en resveratrol pueden también hacerse por incorporación de partes del cultivo o por incorporación de resveratrol aislado del cultivo. Composiciones adecuadas para ser administradas como alimento, suplemento nutricional, suplemento de nutrición animal, nutracéutico, fármaco o cosmético pueden también hacerse por incorporación de partes del cultivo o por incorporación de resveratrol aislado del cultivo. El resveratrol aislado del cultivo o partes del cultivo pueden utilizarse para la preparación de un preparado nutracéutico para alcanzar un efecto nutricional o para la preparación de un preparado farmacéutico para alcanzar un efecto terapéutico.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativo del alcance de la misma.

### **EJEMPLO 1**

**Producción de resveratrol en células de vid en suspensión en presencia de ciclodextrinas**

### Material vegetal y condiciones de cultivo

Se han utilizado células de vid (*Vitis vinifera*) procedentes de las variedades Gamay rouge, Monastrell albina y Monastrell verde. Las características y condiciones de cultivo del material vegetal utilizado se mencionan a continuación.

- 5        *Vitis vinifera* var. Gamay rouge: Se ha utilizado una línea celular de vid establecida por J.C. Pech en 1978 (ENSAT, Toulouse, Francia) a partir de frutos inmaduros de vid del cultivar Gamay Fréaux. Los callos se mantuvieron en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio basal Gamborg B<sub>5</sub> (Gamborg y col. 1968. *Experimental Cell Research* 50:151-158) suplementado con las vitaminas de Morel (Morel, G. 1970. “Le  
10 problème de la transformation tumorale chez les végétaux”. *Physiologie Végétale*, 8:189-204), hidrolizado de caseína (0,25 g/l), sacarosa (20 g/l) como fuente carbonada y ácido  $\alpha$ -naftalenacético (0,1 mg/l) y kinetina (0,2 mg/l) como hormonas (de aquí en adelante, medio). Este medio se ajusta a pH 6 y se esteriliza mediante la aplicación de calor húmedo (autoclave) durante 20 min a 121,2 kPa (1,2 atm) de presión, adquiriendo la consistencia  
15 sólida mediante la adición de agar purificado (8 g/l), cuando el medio se enfría. Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables obtenidos en el medio anteriormente descrito, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de medio sin agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C bajo un fotoperiodo de 14 horas de iluminación (6 W/m<sup>2</sup>) y 10 h de oscuridad.
- 20        *Vitis vinifera* var. Monastrell: Se han utilizado dos líneas celulares de vid del cultivar Monastrell, una establecida en oscuridad (línea albina) y otra establecida en presencia de luz blanca (línea verde), a partir de frutos inmaduros. Todas las manipulaciones e incubaciones para la línea verde fueron realizadas en condiciones de iluminación, pero para la línea albina, las incubaciones para la generación, desarrollo y crecimiento de callos así como las  
25 incubaciones de las suspensiones celulares se realizaron en oscuridad. Para ello, uvas inmaduras de aproximadamente 5 mm de diámetro se esterilizaron superficialmente por inmersión en una disolución de hipoclorito cálcico al 7% durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo y siempre bajo condiciones estériles, las uvas se lavaron 3 veces con agua bidestilada estéril, se eliminaron las semillas y se dividieron en 4 porciones. Estas porciones  
30 (explantos) se depositaron hasta la aparición de microcallos en una placa de Petri que contenía medio de cultivo sólido basado en el descrito por Murashige y Skoog (Murashige, T y Skoog, F. 1962. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

cultures". *Physiologia Plantarum* 15:473-497), suplementado con las vitaminas de Morel, hidrolizado de caseína (0,25 g/l), sacarosa (30 g/l) como fuente carbonada y ácido  $\alpha$ -naftalenacético (0,1 mg/l) y kinetina (0,2 mg/l) como hormonas, 8 g/l de agar purificado y ajustado a pH 6. Finalmente estos microcallos se transfirieron a matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml de este mismo medio de cultivo sólido para el desarrollo de los callos. Las suspensiones celulares se iniciaron, a partir de callos friables, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 80 ml del medio basal Gamborg B<sub>5</sub> suplementado con las vitaminas de Morel, hidrolizado de caseína (0,25 g/l), sacarosa (20 g/l) como fuente carbonada y  $\alpha$ -naftalenacético (0,1 mg/l) y kinetina (0,2 mg/l) como hormonas, en ausencia de agar. Las células en medio líquido se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25°C; la línea verde estaba sometida a un fotoperiodo de 14 horas de iluminación (6 W/m<sup>2</sup>) y 10 h de oscuridad, mientras que la albina estaba siempre en oscuridad.

### Elicitación de las células

En cada experiencia de elicitación se tomaron, en condiciones de esterilidad, 4 g de peso fresco de células que habían sido previamente lavadas con medio fresco y filtradas. Estas células se transfirieron a matraces de 50 ml de capacidad y se repusieron mediante la adición de 10 ml de medio fresco estéril suplementado, en cada caso, con las ciclodextrinas que se indican a continuación:

20

<u>Ciclodextrina</u>	<u>Concentración en el medio (g/l)*</u>
DIMEB	66,5
HYPROB	69,0
MALTOSIL	72,8
Iso P	91,0
SULFOB	92,6
BETA	17,0
RAMEB	65,8
CAVASOL® W7 M	65,5

30

\*Estas concentraciones en g/l se corresponden con concentraciones de 50 mmoles/litro de acuerdo con los respectivos pesos moleculares, a excepción de BETA que corresponde a 15

mmoles/litro debido a su menor solubilidad.

- DIMEB: Heptaquis (2,6-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina de CYCLOLAB , Hungría
- HYPROB: (2-hidroxi) propil- $\beta$ -ciclodextrina grado de sustitución de 5 a 6 de
- 5 ALDRICH, España
- MALTOSIL: Maltosil- $\beta$ -ciclodextrina grado de sustitución 1 de BICO, Japón
- Iso P: Isoleat P –nombre comercial de un producto poco purificado con un contenido en ciclodextrinas >80%, siendo Maltosil-ciclodextrina>50% de BICO, Japón
- 10 SULFOB: sal sódica de  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada de ALDRICH, España
- BETA:  $\beta$ -ciclodextrina o cicloheptaamilosa de SIGMA, España
- RAMEB:  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente grado de sustitución entre 12 y 13 de CYCLOLAB, Hungría
- CAVASOL® W7 M:  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente grado de sustitución
- 15 entre 11 y 13 de WACKER, Alemania

Los matraces se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente durante periodos de tiempo comprendidos entre 24 y 96 horas.

## 20 Análisis de *trans*-resveratrol en el medio extracelular

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron separadas del medio por filtración realizando un ligero vacío con la ayuda de una bomba de agua, recogiendo por separado las células y el filtrado.

- Se ha comprobado que *trans*-resveratrol es la única especie existente en el filtrado
- 25 que absorbe luz a 306 nm detectada mediante análisis por HPLC (LaChrom, Merck-Hitachi), registro en línea de los espectros de las especies químicas por detector de diodo-array (L-7450) y comparación con una librería de compuestos fenólicos construida en las mismas condiciones. Para ello una alícuota del filtrado se diluyó en medio fresco, se filtró a través de filtro Anopore de 0,2  $\mu$ m y 20  $\mu$ l del filtrado se inyectaron en una columna LiChrospher 100
- 30 RP-18 (250x4 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m). Como fase móvil se utilizaron dos clases de disolventes: disolvente A, 0,05% de ácido trifluoroacético en agua y disolvente B, 0,05% de ácido trifluoroacético en metanol:acetonitrilo 60:40 vol/vol. La muestra se eluye a un flujo

de 1 ml/min de la siguiente mezcla de disolventes: 0 min, 10% B; 5 min, 15% B; 40 min, 35% B; 45 min, 65% B; 50 min, 65% B; 55 min, 10% B; y a una temperatura de la columna de 35°C (Dalluge et al., 1998. *J. Chromatogr. A* 793:265-274). La Figura 1 muestra el resultado de este análisis efectuado con el sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis*  
 5 *vinifera* var. Gamay correspondientes al inicio de la incubación y a las 96 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene RAMEB.

Para análisis rutinario de t-resveratrol, una alícuota del filtrado fue diluida con medio fresco y su espectro de absorción ultravioleta fue registrado usando un espectrofotómetro Kontron Uvikon 940 usando como referencia el medio fresco. La concentración de t-  
 10 resveratrol en el sobrenadante fue estimada utilizando un coeficiente de extinción molar a 306 nm de  $26.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Siemann, E.H. and Creasy, L.L. 1992, "Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine", *Am. J. Enol. Vitic.* 43:49-52). La Figura 2 muestra el espectro UV de una disolución de t-resveratrol auténtico (Sigma) y de sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Gamay correspondiente al inicio de la incubación y a  
 15 las 96 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene RAMEB.

La Figura 3 muestra el espectro UV-vis de t-resveratrol auténtico (Sigma) puro y de sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Monastrell correspondientes al inicio de la incubación y a las 48 horas de incubación en un medio de cultivo que contiene RAMEB. En dicha Figura 3 se pueden observar unas diferencias significativas con respecto  
 20 al espectro del *trans*-resveratrol puro. Este resultado es indicativo de que pueden estar acumulándose otros compuestos además de *trans*-resveratrol. Por consiguiente, el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos fenólicos se ha realizado mediante la separación, identificación y cuantificación por HPLC de los mismos. La Figura 4 muestra el resultado de este análisis sobre el sobrenadante de un cultivo de células de *Vitis vinifera* var. Monastrell  
 25 correspondiente al inicio de la incubación y a las 48 horas de incubación en un medio que contiene RAMEB.

#### **Producción y acumulación de resveratrol por células de vid (*Vitis vinifera*) en suspensión en presencia de diversas ciclodextrinas**

30 Los resultados obtenidos, expresados en mg de t-resveratrol por litro de filtrado, elicitando las células con distintas ciclodextrinas a concentraciones de 50 mmoles/litro de medio de cultivo (a excepción de BETA que corresponde a 15 mmoles/litro debido a su

menor solubilidad), tras 96 horas de incubación se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1**

**Miligramos de resveratrol por litro de filtrado del cultivo de células de vid elicidadas  
5 con diversas ciclodextrinas tras 96 horas de incubación**

Tipo de Ciclodextrina	[ciclodextrina] en el medio (g/l)*	Trans-Resveratrol (mg/l)		
		Gamay Rouge**	Monastrell albina	Monastrell verde***
DIMEB	66,5	3060	4680	90
HYPROB	69,0	990	4110	90
MALTOSIL	72,8	390	660	20
Iso P	91,0	240	810	30
SULFOB	92,6	0	0	0
BETA	17,0	30	60	0
RAMEB	65,8	3320	5027	101
CAVASOL® W7 M	65,5	3280	4963	92

\*Estas concentraciones en g/l se corresponden con concentraciones de 50 mmoles/litro de acuerdo con los respectivos pesos moleculares, a excepción de BETA que corresponde a 15 mmoles/litro debido a su menor solubilidad.

10 \*\*Presencia ocasional de otros productos fenólicos no identificados

\*\*\*Presencia abundante de cis-Resveratrol

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las BCDMA, concretamente RAMEB y CAVASOL® W7 M, tienen mayor capacidad de inducción de la síntesis de t-resveratrol en células de vid en suspensión que cualquier otra de las ciclodextrinas  
15 ensayadas, algunas de las cuales no llegan a producir el efecto elicitor de la síntesis de t-resveratrol y otras como SULFOB incluso son tóxicas y matan las células. Adicionalmente se observa que la intensidad del efecto depende de la variedad y de la línea celular (se observa más producción en la variedad Monastrell albina que en la variedad Monastrell verde).

### **Solubilidad de t-resveratrol en medio acuoso**

Cinco mililitros de una disolución 11.410 mg/l de t-resveratrol (99% de pureza según proveedor Sigma, Madrid) en etanol fue depositada en un frasco esférico y el etanol se evaporó hasta sequedad con una corriente de N<sub>2</sub>. El etanol residual se eliminó manteniendo el frasco a baja presión durante la noche. Cinco mililitros de medio acuoso se añadieron al residuo sólido, el frasco se cerró herméticamente y se mantuvo en agitación a 25°C durante 5 días en oscuridad. La suspensión resultante se filtró a través de filtros Anopore de 0,2 µm y se analizó la concentración de t-resveratrol en el filtrado por espectroscopía UV.

La concentración de t-resveratrol en los filtrados, expresada en mg de t-resveratrol por litro de filtrado, se presenta en la Tabla 2.

<b>Tabla 2</b>	
<b>Solubilidad de t-resveratrol en medio acuoso</b>	
<b>Medio acuoso</b>	<b>mg t-resveratrol/litro filtrado</b>
Agua ultrapura	36,5
Medio de cultivo	48,8
Medio de cultivo suplementado con 6,55 mg/ml de DIMEB	735
Medio de cultivo suplementado con 6,55 mg/ml de RAMEB	786
Medio de cultivo suplementado con 6,55 mg/ml de CAVASOL® W7 M	767



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de resveratrol en un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural, en suspensión, que comprende incubar dichas  
5 células en presencia de una  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente (BCDMA) con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 bajo condiciones que permiten la síntesis de resveratrol y su excreción al medio de cultivo, y, si se desea, aislar el resveratrol del medio de cultivo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células productoras de resveratrol de forma natural comprenden células procedentes de *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucaliptus sp.*, *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactilifera*, *Festuca versuta*, *Carex fedia* o *Veratrum grandiflorum*.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, es un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  y cuyos grupos hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o  
20 derivatizados mediante metilación, portando grupos químicos metoxi, con la condición de que posea de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 es la ciclodextrina identificada como RAMEB o la  
25 ciclodextrina identificada como CAVASOL® W7 M.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células productoras de resveratrol son células de *Vitis vinifera*, que se cultivan en medio líquido, con una relación de hormonas auxina/citokinina intermedia, en presencia de dicha BCDMA con un grado de  
30 sustitución comprendido entre 11 y 13, con agitación orbital, a una temperatura comprendida entre 20°C y 28°C, bajo un fotoperiodo de 0 a 16 horas de iluminación y de 8 a 24 horas de

oscuridad.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el resveratrol producido es el isómero *trans*-resveratrol.

5

7. Un método para inducir la síntesis de resveratrol en un cultivo de células productoras de resveratrol de forma natural, en suspensión, que comprende incubar dichas células en presencia de una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 bajo condiciones que permiten la síntesis de resveratrol por dichas células.

10

8. Método según la reivindicación 7, en el que dichas células productoras de resveratrol de forma natural comprenden células procedentes de *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucaliptus sp.*, *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactilifera*, *Festuca*  
15 *versuta*, *Carex fedia* o *Veratrum grandiflorum*.

9. Método según la reivindicación 7, en el que dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, es un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  y cuyos grupos  
20 hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o derivatizados mediante metilación, portando grupos químicos metoxi, con la condición de que posee de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha BCDMA con un grado de  
25 sustitución comprendido entre 11 y 13 es la ciclodextrina identificada como RAMEB o la ciclodextrina identificada como CAVASOL® W7 M.

11. Método según la reivindicación 7, en el que dichas células productoras de resveratrol son células de *Vitis vinifera*, que se cultivan en medio líquido, con una relación  
30 de hormonas auxina/citokinina intermedia, en presencia de dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, con agitación orbital, a una temperatura comprendida

entre 20°C y 28°C, bajo un fotoperiodo de 0 a 16 horas de iluminación y de 8 a 24 horas de oscuridad.

12. Método según la reivindicación 7, en el que el resveratrol producido es el isómero  
5 *trans*-resveratrol.

13. Un método para acumular en un medio de un cultivo de células productoras de resveratrol en suspensión, el resveratrol excretado por dichas células, a concentraciones superiores al límite de solubilidad en dicho medio exento de ciclodextrinas, que comprende  
10 añadir una BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 a dicho medio de cultivo.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dichas células productoras de resveratrol son células productoras de resveratrol de forma natural o células no productoras  
15 de resveratrol de forma natural pero que han adquirido la capacidad de producir resveratrol.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células productoras de resveratrol comprenden células procedentes de *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucaliptus sp.*,  
20 *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactilifera*, *Festuca versuta*, *Carex fedia* o *Veratrum grandiflorum*.

16. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células productoras de resveratrol comprenden células procedentes de una planta no productora de resveratrol de  
25 forma natural, transgénicas.

17. Método según la reivindicación 13, en el que dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, es un maltooligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  y cuyos grupos  
30 hidroxilo de las posiciones 2, 3 y 6 de las unidades de D-glucosa pueden estar libres o derivatizados mediante metilación, portando grupos químicos metoxi, con la condición de que posee de 11 a 13 grupos metoxi por anillo de ciclodextrina.

18. Método según la reivindicación 17, en el que dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13 es la ciclodextrina identificada como RAMEB o la ciclodextrina identificada como CAVASOL® W7 M.

5

19. Método según la reivindicación 13, en el que dichas células productoras de resveratrol son células de *Vitis vinifera*, que se cultivan en medio líquido, con una relación de hormonas auxina/citokinina intermedia, en presencia de dicha BCDMA con un grado de sustitución comprendido entre 11 y 13, con agitación orbital, a una temperatura comprendida  
10 entre 20°C y 28°C, bajo un fotoperiodo de 0 a 16 horas de iluminación y de 8 a 24 horas de oscuridad.

20. Método según la reivindicación 13, en el que el resveratrol acumulado es el isómero *trans*-resveratrol.